PCR-Aufreinigung

J. Arnemann

Abteilung Molekulargenetik, Labor Dr. Wisplinghoff, Köln, Deutschland

Synonym(e) PCR-Fragmentisolierung

Englischer Begriff PCR purification

Definition Eine PCR-Aufreinigung ist oftmals zwingend notwendig für eine gezielte Weiterverarbeitung der spezifischen PCR-Fragmente, z. B. für Klonierung oder DNA-Sequenzierung. Das PCR-Produkt nach einer ► **PCR (Polymerase-Kettenreaktion)** besteht neben den generierten, spezifischen DNA-Fragmenten noch aus nicht inkorporierten Primern, gegebenenfalls Primerdimeren, unverbrauchten dNTPs, Salzen, DNA-Polymerase oder auch unspezifischen PCR-Produkten.

Beschreibung Für die PCR-Aufreinigung wurden verschiedene Methoden entwickelt, die auch als Kits kommerziell verfügbar sind:

1. Eine klassische Methode ist die Aufreinigung der PCR-Fragmente durch Gelaufreinigung. Während Salze, Primerdimere und unspezifische PCR-Produkte gut entfernt werden, ist die Methode recht zeitaufwendig und mit oftmals geringer Ausbeute.
2. Eine weitere Methode ist die Aufreinigung der PCR-Reaktion über Silica-Säulen (sog. Spin-Columns). Salze,

Primer und unspezifische DNA-Fragmente <100 bp werden entfernt, während unspezifische PCR-Fragmente >100 bp nicht vom eigentlichen PCR-Fragment abgetrennt werden. Diese Methode ist sehr schnell, aber auch relativ teuer.

3. Eine weitere Methode zur Aufreinigung der PCR-Reaktionsprodukte ist der Einsatz von „magnetic beads“ (magnetische Kügelchen). Die „magnetic beads“ sind paramagnetische Kügelchen, die mit Silica-Molekülen an ihrer Oberfläche überzogen sind. Unter definierten Salz- und pH-Bedingungen können die DNA-Fragmente an die Silica-Oberfläche binden. Durch Anlegen eines magnetischen Felds, z. B. magnetischer Tube-Ständer, werden die gebundenen und nun magnetischen DNA-Fragmente z. B. an der seitlichen Wand eines Reaktionsgefäßes festgehalten, während die Flüssigkeit komplett abpipettiert und die Fragmente in einem weiteren Waschschrift aufgereinigt werden können. Auch hier lassen sich größere unspezifische PCR-Fragmente nicht sauber von den eigentlichen DNA-Fragmenten abtrennen.
4. Eine enzymatische Aufreinigung stellt die ExoSAP-IT-Methode dar. Ein Enzymgemisch aus Exonuklease I und Shrimps-Alkalische-Phosphatase (ExoSAP) wird der PCR-Reaktion zugegeben und bei 37 °C inkubiert. Hierbei werden überschüssige Primer abgebaut und noch vorhandene Nukleotide dephosphoryliert. Durch einen Hitzeschritt bei 80 °C wird das Enzymgemisch inaktiviert. Die „behandelte“ PCR-Reaktion kann direkt weiter verwendet werden.

Literatur

Siehe online Produktbeschreibungen kommerzieller Anbieter